

10/575026

IAP20 Rec'd PCT/PTO 07 APR 2006

Direkte Beobachtung molekularer Veränderungen in biologischen Testsystemen mittels  
Messungen der Fluoreszenz-Lebensdauer

Bei der Erfindung handelt es sich um eine Methode zum direkten Nachweis der Veränderung eines Moleküls, das einen Fluoreszenz-Farbstoff trägt, mittels Messung der Fluoreszenz-Lebenszeit.

5 *Einführung in Fluoreszenz-Spektroskopie*

Alle Vorgänge, die beim Übergang eines angeregten Moleküls in dessen energetischen Grundzustand mit einer Emission von Strahlung einhergehen, werden als Lumineszenz bezeichnet und allgemein in Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterteilt. Daneben kann die Anregungsenergie durch verschiedene nichtstrahlende Prozesse abgegeben werden.

- 10 Fluoreszenz tritt beim Übergang vom niedrigsten Schwingungsniveau des angeregten Singulettzustandes  $S_1$  in ein Schwingungsniveau des Singulettgrundzustandes  $S_0$  auf. Die Übergangsrate  $k_f$  liegt im Bereich von  $10^7$  bis  $10^{12} \text{ s}^{-1}$ . Die Fluoreszenzanregung erfolgt bei einer geringeren Wellenlänge, als die Fluoreszenzemission, da zwischen Aufnahme und Abgabe der Strahlungsenergie Energie durch strahlungslose Prozesse verloren geht.
- 15 Die Fluoreszenz-Lebensdauer (FLT) ist ein Maß für die Zeit, die ein Molekül im Mittel im angeregten Zustand verweilt, ehe die Fluoreszenz-Emission erfolgt. Die Strahlungslebensdauer  $\tau_f$  entspricht der inversen Fluoreszenz-Übergangsrate  $k_f$ . Im Gegensatz zu dieser Strahlungslebensdauer angeregter Moleküle müssen für eine Betrachtung der tatsächlichen - messbaren - FLT  $\tau$  der angeregten Moleküle die strahlungslosen Prozesse mit einbezogen werden:  $\tau = \frac{1}{k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_Q}$ ,
- 20 mit  $k_{ic}$  = Rate für Übergänge zwischen Schwingungszuständen,  $k_{isc}$  = Rate für Übergänge in Triplett-Zustände,  $k_Q$  = Quench-Rate. Daraus wird u.a. ersichtlich, dass ein Fluoreszenz-Quencher die FLT erniedrigt. Eine ähnliche Wirkung entfalten sogenannte Akzeptor-Farbstoffe, die die Anregungsenergie des Donor-Farbstoffes strahlungslos in einem Resonanz-Phänomen aufnehmen und die aufgenommene Energie entweder strahlungslos oder als Fluoreszenz abgeben. Dadurch
- 25 wird die FLT des Donor-Farbstoffes ebenfalls erniedrigt.

*Methoden zur Messung der Fluoreszenzlebensdauer (FLT)*

Zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden werden zur Messung der FLT angewandt: Messungen in der Zeit-Domäne (TD) und Messungen in der Frequenz-Domäne (FD).

- 30 In der TD-FLT wird die Probe mit einem kurzen Lichtpuls angeregt und die Fluoreszenzabklingkurve gemessen. Grundsätzlich kann man entweder für jeden Blitz die komplette Abklingkurve aufnehmen. Dazu ist aber ein hochzeitauflösender Transientenrekorder nötig mit einer Bandbreite

- im Giga-Hertz-Bereich. In den meisten Fällen wird aber die sogenannte „Time correlated single photon counting“(TCSPC)-Methode angewandt. TCSPC ist eine digitale Technik, die Photonen zählt, die zeitlich mit dem Anregungspuls korrelieren. Bei diesem Verfahren beginnt das Experiment mit einem Anregungspuls, der die Probe anregt und eine sehr schnelle Uhr startet.
- 5 Sobald das erste emittierte Fluoreszenz-Photon am Detektor ankommt, stoppt die Uhr und die Zeit wird abgespeichert. Dieser Vorgang wiederholt sich vielfach. Da der Prozess der Fluoreszenz-emission ein statistischer Vorgang ist, erhält man unterschiedliche Zeiten. Trägt man die Häufigkeit dieser Messzeiten gegen die Messzeit auf, so erhält man eine Fluoreszenz-Abklingkurve, deren Zeitkonstante die FLT ist (s. Fig. 1).
- 10 Die Alternative zu FLT-Messungen in der Zeitdomäne sind Messungen in der Frequenz-Domäne, die auch phasenmoduliert genannt werden. Die Probe wird mit einem kontinuierlichen Laser angeregt, dessen Lichtintensität mit einer Sinuskurve moduliert wird. Üblicherweise werden Frequenzen in der Größenordnung der Fluoreszenzübergangsraten verwendet. Wenn ein Fluoreszenzfarbstoff derart angeregt wird, so wird die Emission gezwungen, dieser Modulation zu folgen.
- 15 Je nach FLT wird die Emission relativ zur Anregung verzögert. Diese Verzögerung wird als Phasenverschiebung gemessen, aus der die FLT berechnet werden kann. Außerdem nimmt die maximale Differenz zwischen dem Maximum und Minimum des modulierten Emissionssignals mit zunehmender FLT ab, so dass die FLT auch daraus berechnet werden kann.

#### *Fluoreszente Messmethoden für die Detektion biologischer Testsysteme*

- 20 Für die Detektion biochemischer Testsysteme unter dem Aspekt des hohen Durchsatzes und hoher Stabilität haben sich u.a. folgende Methoden bewährt:
- Die Messung der Fluoreszenzintensität kann z.B. dazu verwendet werden, um die Fluoreszenzzunahme einer Protease-Reaktion mit einem fluorogenen Peptid-Substrat, von dem fluoreszentes Aminocoumarin (AMC) abgespalten wird, zu messen. In der Regel werden große Signale
- 25 gemessen, aber die Autofluoreszenz von Screening-Substanzen könnte stören. Außerdem ist das Fluoreszenzintensitätssignal anfällig für den sogenannten „inner Filter Effekt“, wenn sich in der Lösung eine absorbierende Substanz befindet. Dynamische Fluoreszenzlöschung durch Molekül-Kollision wie auch Lichtstreuung in trüben Lösungen kann ebenso stören wie das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes oder Volumen-/Meniscus-Effekte. Außerdem ist das Fluoreszenzsignal
- 30 abhängig von der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes und von der Temperatur. All diese Störquellen werfen für die Stabilität solcher Assays und für deren Einsatz als Screeningmethode Fragen auf. Andererseits sind derartige Assays sehr leicht bei sehr kurzen Messzeiten durchführbar und haben sich deshalb zu einem Standard im HTS entwickelt.

Wird ein kleines fluoreszentes Molekül z.B. durch einen wesentlich größeres Molekül (z.B. ein Protein) gebunden, so kann die verlangsamte Rotationsdiffusion des entstandenen großen Molekülkomplexes durch die Messung der stationären Fluoreszenzpolarisation gemessen werden. Auch diese Methode hat sich inzwischen zu einem Standard für Bindungsreaktionen im HTS entwickelt.

5 Störeinflüsse durch den „inner Filter Effekt“, durch Lichtstreuung, Konzentration und Temperatur machen sich nicht bemerkbar. Allerdings wird die Fluoreszenzpolarisation auch durch echtes Kollisions-Quenching, Autofluoreszenz, Volumen und Meniskus der Lösung beeinflusst.

Eine weitere Methode für Bindungsereignisse nutzt den Fluoreszenzresonanzenergie-Transfer (FRET) zwischen einem Donor- und Akzeptorfarbstoff, bei denen das Emissionsspektrum des

10 Donor-Farbstoffes mit dem Anregungsspektrum des Akzeptorfarbstoffes überlappt, aus. In der betreffenden Bindungsreaktion muss ein Partner den Donor-Farbstoff und der andere Partner den Akzeptor-Farbstoff tragen. Nur bei Bindung kommt es durch die räumliche Nähe zum FRET. Bei der Messung des FRET's stören „inner Filter Effekt“, Quencher und Autofluoreszente Substanzen. Lichtstreuung, Photobleaching, Volumen- u. Meniskuseffekte wie auch Konzentration und Tem-

15 peratur stören dagegen nicht. Daher sind sowohl Fluoreszenzpolarisation als auch FRET im Vergleich zur Fluoreszenzintensität relativ robuste Methoden zur Messung der Interaktion von Molekülen.

Im Vergleich zu den genannten Fluoreszenzmethoden ist die Fluoreszenz-Lebenszeit (FLT) erheblich robuster. Sie wird nur in einigen Fällen von stark autofluoreszenten Substanzen mit

20 vergleichbarer FLT gestört. Aber weder „inner Filter Effekt“, noch Kollisions-Quencher, Photobleaching, Volumeneffekte oder Konzentration beeinflussen die FLT. Diese Eigenschaften prädestinieren diese robuste Methode für den Einsatz im Screening. Auf der anderen Seite sind für FLT noch keine Screening-Assays etabliert, was bisher hauptsächlich durch den geringen Durchsatz und hohe Kosten für die Instrumentierung begründet ist. Moderne Entwicklungen von

25 leistungsstarken und stabilen Lasern sowie Detektionssystemen ermöglichen neuerdings den Einstieg in FLT-Messungen auf Mikrotiterplatten und somit ins Substanz-Screening. So hat die Firma Tecan mit dem Ultra Evolution Ende 2002 erstmals ein kommerzielles Gerät zur Auslesung von Mikrotiterplatten auf den Markt gebracht.

#### *Bekannte FLT-Applikationen:*

30 Die Messung der FLT wurde auf verschiedenste biologische Fragestellungen angewendet. Dabei wurden entweder fluoreszente Sondenmoleküle eingesetzt, die bei Bindung von Kationen wie z.B.  $\text{Ca}^{2+}$  (Schoutteten L., Denjean P., Joliff-Botrel G., Bernard C., Pansu D., Pansu R.B., *Photochem. Photobiol.* 70, 701-709 (1999)),  $\text{Mg}^{2+}$  (Szmacinski H., Lakowicz J.R., *J.Fluoresc.* 6, 83-95 (1996)),  $\text{H}^+$  (Lin H.J., Szmacinski, *Anal. Biochem.* 269, 162-167 (1999)),  $\text{Na}^+$  (Lakowicz J.R., Szmacinski

- H., Nowaczyk K., Lederer W.J., Kirby M.S., Johnson M.L., *Cell Calcium* 15, 7-27 (1994)),  $K^+$  (Szmajewski H., Lakowicz J.R. in „Topics in Fluorescence Spectroscopy“ Vol. IV, (Lakowicz, J.R., Ed.), 295-334 (1994)) oder Anionen wie z.B.  $Cl^-$  (A.S. Verkman, *Am.J.Physiol* 253, C375-C388 (1990)) ihre Fluoreszenzeigenschaften und insbesondere die Fluoreszenz-Lebenszeiten verändern.
- 5 Oder die Änderung der Fluoreszenzlebenszeit wird erreicht durch eine Bindungsreaktion mit einem Molekül, das entweder durch Resonanz-Energietransfer (Quench oder FRET) zu einer kleineren FLT für den Donor-Farbstoff führt, oder in seltenen Fällen eine größere FLT bedingt. Mit Hilfe der Bindung eines Cy3-markierten Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers wurde z.B. die Aktivität einer Rezeptor Tyrosin-Kinase gemessen (F.S. Wouters, P.I.H. Bastiaens, *Current*
- 10 *Biology* 9, 1127-1130, 1999).

Es wird bisher keine Anwendung eines biologischen Testsystems beschrieben, wo die Änderung der FLT zur Messung der Modifikation eines Moleküls verwendet wird, ohne dass eine Bindungsreaktion involviert ist. Auf der anderen Seite wäre ein Assay, bei dem die Veränderung eines Moleküls, z.B. eines Substrates durch ein Enzym, direkt gemessen wird, von großem

15 Vorteil. Denn der Substratumsatz eines Substrates könnte direkt gemessen werden, ohne dass eine Enzym-Kaskade oder Bindungsreaktion benötigt wird, die den primären Substratumsatz indirekt sichtbar macht. Der Vorteil für ein Substanzscreening liegt darin, dass die getesteten Substanzen nicht mehr mit den Nachweisreaktionen interferieren können. Damit ließen sich vorgetäuschte Hits oder Substanzen, die aufgrund der Interferenzen nicht bewertet werden können, vermeiden.

#### 20 *Screening-Assay-Formate für Kinasen/Phosphatasen*

Protein-(De-)Phosphorylierung ist ein allgemeiner regulatorischer Mechanismus, mit dem Zellen selektiv Proteine modifizieren, die regulatorische Signale von außen in den Zellkern vermitteln. Die Proteine, die diese biochemischen Modifikationen ausführen gehören zur Gruppe der Kinasen bzw. Phosphatasen. Phosphodiesterasen hydrolysieren den sekundären Botenstoff cAMP bzw.

25 cGMP und nehmen auf diese Weise ebenfalls Einfluss auf zelluläre Signaltransduktionswege. Daher dienen diese Enzyme als hochinteressante Zielmoleküle der Pharma- und Pflanzenschutzforschung.

Für das Screening von Kinasen haben sich verschiedene Formate etabliert, denen gemeinsam ist, dass die Phosphorylierungsreaktion (abgesehen von radioaktiven Methoden) immer indirekt ge-

30 messen wird. Daher sind diese Verfahren grundsätzlich störanfällig durch Substanzen, die mit der nachgeschalteten Enzymkaskade oder Bindungsreaktion interferieren. Einige Methoden sind sogar nur auf Tyrosin-Kinasen begrenzt.

Traditionelle Methoden zur Messung des Phosphorylierungszustandes zellulärer Proteine basieren auf den Einbau von radioaktivem  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate. Die  $^{32}\text{P}$ -phosphorylierten Proteine werden auf einem Gel getrennt und anschließend mit einem Phospho-Imager sichtbar gemacht. Alternativ können phosphorylierte Tyrosinreste durch Bindung von radioaktiv markierten anti-Phosphotyrosin-Antikörpern gebunden und durch Immunoassays z.B. Immunoprecipitation oder Blotting, nachgewiesen werden. Da diese Methoden radioaktive Isotopen nachweisen müssen, sind sie zeitaufwendig und auch aufgrund der Sicherheitsaspekte im Umgang mit radioaktiven Substanzen nicht für die Hochdurchsatz-Wirkstofffindung (uHTS, ultra high throughput screening) geeignet.

Neuere Methoden ersetzen die radioaktiven Immunoassays durch ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assay). Diese Methoden verwenden aufgereinigte Substratproteine oder synthetische Peptidsubstrate, die auf einer Substratoberfläche immobilisiert sind. Nach Einwirkung einer Kinase wird das Ausmaß der Phosphorylierung dadurch quantifiziert, indem anti-Phosphotyrosin-Antikörper, die mit einem Verstärkerenzym wie z.B. Peroxidasen gekoppelt sind, an die phosphorylierten immobilisierten Substrate binden.

Epps. et al. (US 6203994) beschreiben einen Fluoreszenz-basierten HTS-Assay für Protein Kinasen und Phosphatasen, der fluoreszenzmarkierte phosphorylierte Reportermoleküle und Antikörper, die spezifisch die phosphorylierten Reportermoleküle binden, verwendet. Die Bindung wird mittels Fluoreszenzpolarisation, Fluoreszenzquench oder Fluoreszenz Correlations Spektroskopie (FCS) gemessen. Dieses Verfahren hat den intrinsischen Nachteil, dass es nur gute generische Antikörper (z.B. clone PT66, PY20, Sigma) für Phosphotyrosin-Substrate gibt. Es werden nur wenige Beispiele von geeigneten anti-Phosphoserin- bzw. anti-Threonin-Antikörpern berichtet (z.B. Bader B. et al., Journal of Biomolecular Screening, 6, 255 (2001), Panvera-Kit No. P2886). Diese Antikörper haben aber die Eigenschaft, nicht nur Phosphoserin, sondern auch die benachbarten Aminosäuren als Epitop zu erkennen. Es ist aber bekannt, dass Kinasen sehr substratspezifisch arbeiten und sich die Substratsequenzen stark unterscheiden können. Daher sind anti-Phosphoserin-Antikörper nicht als generische Reagenzien einsetzbar.

Die Firma Perkin Elmer (Wallac) bietet für Tyrosin-Kinasen einen Assay an, der auf zeit-aufgelöster Fluoreszenz und einem Energietransfer von Europium-Chelaten auf Allophycocyanin beruht (s.auch EP929810). Auch hier ist das Verfahren durch die Verwendung von Antikörpern im wesentlichen auf Tyrosin-Kinasen beschränkt.

Die Firma Molecular Devices bietet seit kurzem Nanopartikel mit geladenen Metall-Kationen auf der Oberfläche als generisches Bindungsreagenz an, dass für Phosphorylierungsreaktionen sowohl an Tyrosin, als auch an Serin und Threonin geeignet ist. Die Bindungsreaktion wird aber im stark sauren pH von ca. 5 und bei hoher Ionenstärke durchgeführt. Daher ist für die Bindung der

Nanopartikel ein starker Verdünnungsschritt der Reaktion in den Ziel-Puffer notwendig, was bei Assay-Gesamtvolumina von 10 µl im 1536-Format im uHTS problematisch ist. Die Messung der Bindung geschieht auch hier mittels Fluoreszenzpolarisation.

5 Fluoreszenzpolarisation ist als Messmethode relativ aufwendig und erlaubt derzeit noch keine parallele Messung einer Mikrotiterplatte (MTP). Daher wären die Messzeiten für eine 1536-MTP sehr hoch und die parallele Messung von Enzymkinetiken nicht möglich. Außerdem ist die Fluoreszenzpolarisation als Methode auf sehr kleine fluoreszente Substrate beschränkt.

10 Des weiteren kann die Kinase-Aktivität durch den Verbrauch von ATP mittels Firefly-Luciferase bzw. durch die Bildung von ADP mittels nachgeschalteter Enzymkaskade gemessen werden. Diese Assay-Formate haben den Nachteil, dass sie aufgrund der indirekten Messmethode nicht nur stärker streuende Messwerte erzeugen, sondern auch Probleme mit Substanzen haben, die die Kaskaden-Enzyme hemmen.

15 Könnte man die Phosphorylierung/Dephosphorylierung direkt durch Detektion der FLT messen, wäre die Messung direkter und damit weniger behaftet mit systematischen oder zufälligen Fehlern. Außerdem wäre die Limitierung einiger Assay-Formate auf Tyrosin-Kinasen bzw. Phosphatasen beseitigt, da kein spezifischer Antikörper mehr benötigt würde.

#### *Bestehende Assay-Probleme:*

20 Für Proteasen, bei denen C-terminale Aminosäuren abgespalten werden, können in sehr vielen Fällen fluorogene Substrate mit C-terminalen Farbstoffen wie z.B. Aminocoumarin verwendet werden. Endoproteasen, die inmitten von Peptid-Sequenzen schneiden, können meist gut in FRET-Assays gemessen werden, wobei sich die Donor (z.B. EDANS)- und Akzeptor-Farbstoffe (z.B. Dabcyl) an den Enden des Substrates befinden. Durch die Substrat-Spaltung nimmt die Fluoreszenzintensität zu, weil der Akzeptor-Farbstoff den Donor-Farbstoff nicht mehr quenchen kann. Es gibt aber auch Proteasen, für die keine fluorogenen Substrate konstruiert werden können.

25 In solchen Fällen muss die Enzymreaktion entweder mittels aufwendiger chemischer Analytik (z.B. HPLC/MS, GC/MS) oder durch chemische Reaktion oder Enzymkaskaden indirekt gemessen werden. Dadurch müssen alle Nachteile hinsichtlich der Stabilität des Assays und unspezifischer Reaktionen von Screening-Substanzen mit der Nachweisreaktion in Kauf genommen werden. Die aufwendige Analytik ist nicht für das Hochdurchsatz-Screening geeignet. Enzyme, deren Reaktionen - im erforderlichen Durchsatz - nicht direkt gemessen werden können, umfassen solche, die

30 z.B. folgende Modifikationen an Substraten vornehmen: Phosphorylierung/Dephosphorylierung, Sulfatierung/Desulfatierung, Methylierung/Demethylierung, Oxidationen/Reduktionen, Acetylierung/Deacetylierung, Amidierung/Deamidierung, Cyclisierung/Ringspaltung, Konformationsände-

rungen, Abspaltung von Aminosäuren/Peptiden/Ankopplung von Aminosäuren/Peptiden, Ringaufweitung/Ringverkleinerung, Umlagerungen, Substitutionen, Eliminierungen, Additionsreaktionen etc.

*Beschreibung der Erfindung:*

- 5 Die Fluoreszenzlebenszeit (FLT) ändert sich prinzipiell, wenn sich die chemische Umgebung ändert. Allerdings sind derartige FLT-Änderungen bisher noch nicht generell vorhersagbar, insbesondere, wenn es sich um nur kleine molekulare Veränderungen handelt. Daher beinhalteten bisher alle publizierten FLT-Assays immer eine Bindungsreaktion entweder mit einem Sensor-molekül oder mit einem quenchenden Partnermolekül.
- 10 Bei unseren Versuchen hat sich überraschend gezeigt, dass bereits Peptide, die sich nur durch eine Phosphorylierung unterscheiden, eine deutliche FLT-Differenz aufweisen. Weitergehende Experimente haben gezeigt, dass diese Aussage auf ein weiteres Peptid erweitert werden konnte. Um hierfür akzeptable FLT-Differenzen zwischen dem phosphorylierten und nichtphosphorylierten Peptid zu erhalten, mussten zuvor diverse Bedingungen getestet werden. Aus dem Experiment
- 15 wurde aber auch klar, dass FLT-Differenzen durch Änderung von Parametern optimiert werden können. Basierend auf diesen Experimenten sollte es möglich sein, FLT-Messungen auf alle Kinase- und Phosphatase-Reaktionen auszudehnen. Darüber hinaus sollten sich auch andere Reaktionen erschließen lassen, die mit bisherigen Methoden im Hinblick auf HTS-Tauglichkeit nicht oder nur sehr indirekt messen lassen. Generell sollte gelten:
- 20 Ändert sich z.B. der Phosphorylierungszustand eines Eduktes bei Umwandlung in sein Produkt, so sollte ein geeignet angekoppelter Farbstoff diese molekulare Modifikation durch Änderung der FLT anzeigen. Solch eine Methode hat das Potenzial, generisch auf Tyrosin- wie auch Serin-/Threonin-Kinasen sowie Phosphatasen anwendbar zu sein. Ebenso sollte das Prinzip auf andere Modifikationsreaktionen anwendbar sein wie z.B. Sulfatierung/Desulfatierung, Methylierung/De-
- 25 methylierung, Oxidationen/Reduktionen, Acetylierung/Deacetylierung, Amidierung/Deamidierung, Cyclisierung/Ringspaltung, Konformationsänderungen, Abspaltung von Aminosäuren/Peptiden/Ankopplung von Aminosäuren/Peptiden, Ringaufweitung/Ringverkleinerung, Umlagerungen, Substitutionen, Eliminierungen, Additionsreaktionen etc. FLT-Messungen sind aktuell sehr schnell möglich (z.T. 50 ms oder weniger pro well), so dass die Methode für das Hochdurchsatzscreening
- 30 geeignet ist. Besonders vorteilhaft ist für HTS-Anwendungen die große Robustheit gegenüber Störeinflüssen wie z.B. Inner Filter Effect, Autofluoreszenz, Lichtstreuung, Photobleaching, Volumen-/Meniscus-Effekten, Konzentration des fluoreszenten Substrates.

Aus der Anwendung ergibt sich, dass nur 2 Komponenten, Substrat und Enzym, gemischt werden müssen, um die Reaktion zu starten und zu messen. Konventionelle Assayverfahren benötigen in der Regel die Zugabe weiterer Reagenzien, wie z.B. Kaskadenenzyme, damit die Reaktion messtechnisch erfasst werden kann. Mit jedem Pipettierschritt wird ein Pipettierfehler und damit  
5 ein zusätzliche Fehler für das Messresultat verursacht, was man auch Fehlerfortpflanzung nennt. Diese fortgepflanzten Fehler führen zu einer erhöhten Varianz der Messresultate.

Werden dann, wie beim Substanz-Screening sehr kleine Volumina pipettiert, so sind die Fehler jedes einzelnen dieser Schritte nicht mehr zu vernachlässigen. Deshalb ergibt für alle Testsysteme, in denen kleine Volumina pipettiert werden müssen und insbesondere für das Substanzscreening, die  
10 Notwendigkeit, die Anzahl der Fehlerquellen und damit auch der Pipettierschritte zu reduzieren.

Daraus ergibt sich, dass diese Erfindung einfachere, robustere und genauere Messresultate als herkömmliche Assay-Verfahren ermöglicht. Diese Vorteile kommen besonders beim Substanz-Screening zum tragen.

Die erfindungsgemäße homogene Assay-Methode bzw. das erfindungsgemäße Verfahren zur  
15 direkten quantitativen Messung von Molekül-Modifikationen ist dadurch gekennzeichnet, dass das Molekül einen Fluoreszenz-Farbstoff trägt und dass die Fluoreszenz-Lebensdauer des Moleküls sich von der Fluoreszenz-Lebensdauer des modifizierten Moleküls unterscheidet. Dabei kann die Fluoreszenz-Lebensdauer des modifizierten Moleküls größer sein als die des nicht modifizierten Moleküls. Die Erfindung umfasst aber auch eine erfindungsgemäße Assay-Methode, bei der die  
20 Fluoreszenz-Lebensdauer des modifizierten Moleküls geringer ist als die des nicht modifizierten Moleküls.

Bei dem Molekül kann es sich z.B. um ein organisches, insbesondere um ein Peptid oder Peptidomimetikum, oder anorganisches Molekül handeln. Der Fluoreszenzfarbstoff kann z.B. ein Coumarin-, ein Fluorescein-, ein Rhodamin-, ein Oxazin- oder ein Cyanin-Farbstoff sein kann. Der  
25 verwendete Fluoreszenz-Farbstoff kann kovalent oder nicht-kovalent an das Molekül angekoppelt ist. Zwischen dem Fluoreszenz-Farbstoff und dem Molekül kann sich ein Spacer-Molekül befinden. Bestandteil der Erfindung ist ebenfalls die Verwendung der erfindungsgemäßen Assay-Methode bzw. des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Quantifizierung biochemischer Assays. Die erfindungsgemäße Assay-Methode bzw. das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Quanti-  
30 fizierung biochemischer Assays verwendet werden, bei denen Enzyme z.B. folgende Modifikationsreaktionen ausführen können: Phosphorylierung/Dephosphorylierung, Sulfatierung/Desulfatierung, Methylierung/Demethylierung, Oxidationen/Reduktionen, Acetylierung/Deacetylierung, Amidierung/Deamidierung, Cyclisierung/Ringspaltung, Konformationsänderungen, Abspaltung von Aminosäuren/Peptiden/Ankopplung von Aminosäuren/Peptiden, Ringaufweitung/Ring-



verkleinerung, Umlagerungen, Substitutionen, Eliminierungen, Additionsreaktionen etc. Außerdem kann die erfindungsgemäße Assay-Methode bzw. das erfindungsgemäße Verfahren für den Einsatz im Hochdurchsatz-Screening - insbesondere im Hochdurchsatz-Screening zur Identifizierung von pharmazeutischen Wirkstoffen - nutzbringend eingesetzt werden.

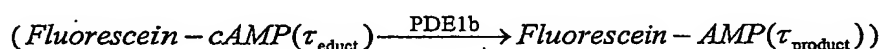
- 5 Bestandteil der Erfindung ist des weiteren ein Reagentien-Kit, der Fluoreszenz-Farbstoff-Molekül-Konjugate und andere Reagenzien enthält, die zur Durchführung der erfindungsgemäßen Assay-Methode bzw. des erfindungsgemäßen Verfahrens benötigt werden.

#### Beschreibung der Figuren:

Fig. 1: Logarithmierte zeitliche Fluoreszenzabklingkurve von 15 nM eines Fluorescein-Peptid-Konjugates. Gemessen auf Ultra FLT Prototyp (TECAN) mittels TCSPC.

Fig. 2: Unterschiede in der Fluoreszenzlebenszeit eines phosphorylierten (1) und nicht-phosphorylierten (2) Peptides (1: Fl-P1, 2: Fl-1). Measurement time 1 s. The mean and standard deviation of 10 measurements is shown.

Fig. 3: Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz-Lebensdauer (FLT in ps) ist gegen die Reaktionszeit (time in s) aufgetragen. Während der Reaktion der Phosphodiesterase PDE1b mit Fluorescein-cAMP



ändert sich die Fluoreszenz-Lebensdauer innerhalb von 100 Minuten von ca. 3500 ps auf ca. 3350 ps. Diese Änderung zeigt direkt die Umwandlung von Fl-cAMP in Fl-AMP an.

20 Durch steigende Konzentrationen an BAY 383045 (grüne Dreiecke: 20 µM, rote Quadrate: 10 µM, violette Kreuze: 5 µM, braune Kreise: 2.5 µM, rosa Quadrate: 1.25 µM, blaue Rauten: 0.7 µM, grüne Pluszeichen: 0.35 µM, dunkelblaue Minuszeichen: 0.17 µM, hellblaue Minuszeichen: 0.08 µM) wird die Enzymreaktion zunehmend gehemmt.

Fig. 4: Die Fluoreszenz-Lebensdauer-Unterschiede zwischen der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form eines Fluorescein-Kemptid-Peptide-Konjugates sind bei verschiedenen pH-Werten bzw. 200 mM NaCl aufgetragen (1: pH 13, 2: pH 9.5, 3: pH 8, 4: pH 7, 5: pH 200 mM NaCl, 7: pH 6).

Fig. 5: Für ein potentiell Edukt ( FJ23, schraffiert) und dessen Produkt (FJ24, schwarz) der Umsetzung mit dem TAFI-Enzym sind die Fluoreszenz-Lebensdauern unter verschiedenen Bedingungen (1: Wasser, 2: pH 6, 3: pH 7, 4: pH 8, 5: pH 9.5, 6: 00mM NaCl, 7: 2 M

NaCl) gemessen worden. Die Fluoreszenz-Lebensdauern sind praktisch unabhängig von den untersuchten Bedingungen. Aber die Fluoreszenz-Lebensdauern von FJ23 (552 ps) und FJ23 (2194 ps) unterscheiden sich sehr deutlich.

**Beispiele:****1. Unterschiede in der Fluoreszenzlebenszeit eines phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Peptides (Fl-P1 vs. Fl-1)****Material:**

5 Fl-P1: Fluorescein-C6-TEGQYpQPQP-COOH, Eurogentec, phosphoryliert

Fl-1: Fluorescein-C6-TEGQYQPQP-COOH, Eurogentec, nichtphosphoryliert

**Durchführung:**

Es sollte untersucht werden, ob sich die Fluoreszenz-Lebensdauer (FLT) der Fluorescein-Peptid-Konjugate Fl-P1 und Fl-1 unterscheiden. Dazu wurden je 10 nM Fl-P1 und Fl-1 in 50 mM HEPES  
10 pH 7.5 gelöst. Die Fluoreszenzlebensdauern (FLT) wurden mittels eines Ultra FLT-Prototypen (Tecan) gemessen. Jeweils 10 Messungen á 1 s wurden gemittelt.

**Ergebnis:**

Die Fluoreszenz-Lebensdauer von Fl-P1 beträgt 3880 ps und die FLT von Fl-1 3600 ps. Da bei einer Messzeit von 1 s die Standardabweichungen mit < 25 ps sehr klein sind, lassen sich beide  
15 Moleküle sehr gut unterscheiden (s. Fig. 2). Aus den Standardabweichungen und den mittleren Fluoreszenz-Lebensdauern von Fl-P1 und Fl-1 kann man für die Leistungsfähigkeit eines potentiellen biologischen Tests mit durch Fl-P1 und Fl-1 aufgespannten FLT-Messfenster einen z'-Faktor von ca. 0.5 berechnen, was für eine Screening-Kampagne ausreichend wäre. Der z'-Faktor wurde von Zhang et al. 1999 zur Bewertung der Leistungsfähigkeit von HTS-Assays eingeführt  
20 (Zhang JH, Chung TDY, Oldenburg KR, J. Biomol. Screen 4, 67-73 (1999)). Die Aktivität einer Kinase wie z.B. p60<sup>src</sup>, die Fl-1 phosphorylieren würde, müsste mittels FLT-Messungen sehr gut messbar sein.

Viele heute verwendete Kinase-Assays sind Endpunkt-Assays, wo die Kinetik nicht kontinuierlich verfolgt werden kann. Vielmehr müssen verschiedene Reaktionen zu verschiedenen Zeiten ge-  
25 stoppt werden und die erhaltenen Messwerte anschließend zu einer Kinetik-Kurve zusammengesetzt werden.

Durch die Messung von Fluoreszenz-Lebensdauern kann die Kinetik der Phosphorylierung ohne Detektions-Enzymkaskade direkt und unmittelbar verfolgt werden. Dies erleichtert insbesondere auch die Einstellung der Inkubationszeit für eine Roboter-Screening-Kampagne.

2. **Optimierung des FLT-Unterschiedes zwischen Fluorescein-markiertem phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem Kemptid-Peptid**

Material:

Fl-P-Kemptid: Fluorescein-C6-LRRApSLGCONH<sub>2</sub>, Eurogentec, phosphoryliert

5 Fl-Kemptid: Fluorescein-C6-LRRASLGCONH<sub>2</sub>, Eurogentec, nichtphosphoryliert

0.1 M NaOH, 50 mM Borat-Puffer pH 9.5, 50 mM HEPES-Puffer pH 8.0, 50 mM HEPES-Puffer pH 7.0, 50 mM MES-Puffer pH 6.0, 200 mM NaCl (low)

Durchführung:

Ein FLT-Assay ist umso besser, je größer die Unterschiede der Fluoreszenz-Lebenszeiten von Edukt und Produkt sind. Nicht in jedem Fall wird man auf Anhieb eine optimal große FLT-Differenz messen. Andererseits sollte es möglich sein die zunächst erhaltene FLT-Differenz zu vergrößern, z.B. durch Auswahl und Kombination verschiedener Parameter wie z.B. Fluoreszenzfarbstoff, Spacer-Molekül zwischen Farbstoff und Substratmolekül, oder Polarität, pH, Ionenstärke des Lösungsmittel oder andere Additive. In diesem Beispiel wird aufgezeigt, wie durch Erhöhung des pH-Wertes eine signifikante Vergrößerung des FLT-Unterschiedes zwischen einer phosphorylierten und einer nicht-phosphorylierten Variante eines Fluorescein-Kemptid-Peptid-Konjugates (Fl-P-Kemptid, Fl-Kemptid) erreicht wurde. Jeweils 50 nM Fl-P-Kemptid und Fl-Kemptid wurden in den unter Material beschriebenen Lösungen gelöst und deren FLT's mittels eines modifizierten Nanoscan-Gerätes (IOM GmbH, Berlin), das die Signale auf einen Transientenrekorder übertrug, gemessen. Für jeden Messpunkt wurden 16 Abklingkurven gemittelt. Der abfallende Teil der logarithmierten Kurve wurde mittels linearer Regression ausgewertet und die negative Steigung in die FLT umgerechnet.

Ergebnis:

In Fig. 4 sind die Differenzen der FLT's von Fl-P-Kemptid und Fl-Kemptid bei verschiedenen Bedingungen angegeben. In diesem Fall ergibt sich, dass die Differenzierung der phosphorylierten und nichtphosphorylierten Form von Kemptide mittels FLT besser wird, wenn sich der pH von 6.0 auf 9.5 erhöht. Das erzielte Ergebnis zusammen mit dem Befund des 1. Beispiels legt nahe, dass durch die Auswahl der richtigen Fluoreszenzfarbstoffe, Spacer und Lösungsmitelegenschaften bzw. Additive für sehr viele, wenn nicht fast alle Paare von phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Peptid-Substraten für Phosphatasen bzw. Kinasen Bedingungen gefunden werden können, die zu einem für das Screening ausreichend großen Unterschied zwischen den

Fluoreszenz-Lebenszeiten zwischen Edukten und Produkten führen. Somit lassen sich für die genannten Enzymklassen generische Assays aufbauen, die denkbar einfach zu entwickeln sind. Wenn die richtigen Reaktionsbedingungen für die Enzyme abgeklärt wurden, bedarf die Reaktion nur noch der Mischung von Enzym und Substrat. Die folgende Kinetik kann unmittelbar und direkt verfolgt werden. Dadurch lassen sich Inkubationszeiten an HTS-Roboter-Anlagen einfach einstellen. Aufgrund der robusten Messgröße Fluoreszenzlebenszeit wirken sich leichte Schwankungen von Volumen und Substrat-Konzentration nur geringfügig auf das Messergebnis aus. Darüber hinaus gilt generell, dass solch ein Assay mit wenig Pipettierschritten deutlich robuster, als andere Standard-Assays mit zusätzlichen Pipettierschritten, wie sie z.T. durch Detektions-Enzymkaskaden erforderlich werden.

### 3. PDE-Reaktion

#### Material:

Fl-cAMP: 8-Fluo-cAMP, BIOLOG Life Science Institute

PDE1b: Phosphodiesterase 1b (Labor Dr. A. Tersteegen, Bayer AG)

15 BAY 383045: Bayer AG

#### Durchführung:

Phosphodiesterasen stellen wie die zuvor behandelten Phosphatasen und Kinasen eine sehr bedeutsame Klasse von Targets u.a. in den Indikationsgebieten Herz-Kreislauf, Metabolische Krankheiten, Zentrales Nervensystem, Krebs und Respiratorische Krankheiten dar. Daher ist es von hohem Interesse, ein generisches Assay-Format zu haben, das die Umwandlung von cAMP bzw. cGMP in die jeweiligen Monophosphate messen kann. Üblicherweise werden Detektions-Enzymkaskaden verwendet. In diesem Beispiel wird gezeigt, dass es möglich ist, die Phosphodiesterase-Reaktion direkt zu messen. Im Experiment wurden zunächst 1  $\mu$ M Fl-cAMP und eine 1:360-Verdünnung von PDE1b in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Inhibitors BAY 383045 gemischt. Die Kinetik der Enzymreaktion wurde mittels eines Ultra FLT-Prototypen (Tecan) bei Raumtemperatur gemessen.

#### Ergebnis:

Die FLT von Fl-cAMP ändert sich – ohne Inhibitor – im Laufe der Reaktion zu Fl-AMP innerhalb von 100 Minuten von ca. 3500 ps auf ca. 3350 ps. Steigende Konzentrationen von BAY 383045 hemmen die Enzymreaktion zunehmend (s. Fig. 3). Durch die deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der Phosphodiesterase-Reaktion wurde gezeigt, dass die Änderung der

Fluoreszenzlebensdauer des Fl-cAMP eindeutig mit der Enzymaktivität zusammenhängt. Dadurch ist der Nachweis erbracht, dass mit dieser Methode prinzipiell nach Substanzen gesucht (gescreent) werden kann, die Phosphodiesterasen hemmen. Das Messprinzip sollte aber auch auf Kinase- und Phosphatase- und andere Enzym-Assays erweiterbar sein, wenn bei der enzymatischen

5 Modifikation des Substrates eine messbare FLT-Änderung auftritt. Wie bei den zuvor diskutierten Phosphatase- und Kinase-Assays sollte ein Phosphodiesterase-Assay mit direkter FLT-Detektion der Substratmodifikation aufgrund des störunanfälligen Messsignals und wenigen Pipettierschritten sehr robust sein. Man könnte mit der beschriebenen Assay-Methode ausschließen, dass Substanzen mit Detektions-Enzyme interferieren. Für die beschriebene Assay-

10 Methode auf Basis von Fluoreszenz-Lebensdauer-Messungen gilt generell: Die Inkubationszeiten von Phosphodiesterase-, Kinase- und Phosphatase-Assays wie auch anderen Enzym-Assays lassen sich durch die direkte und unmittelbare Messung der Enzymkinetik in einem Experiment sehr leicht und genau für eine Roboter-Hochdurchsatz-Screening-Kampagne einstellen.

4. Unterschied in der Fluoreszenz-Lebenszeit zwischen Edukt und Produkt der TAFI-Enzymreaktion:

Material: FJ23: Evoblue30-Ttds(Spacer)-IFTR-COOH, Jerini Peptide Technologies

FJ24: Evoblue30-Ttds(Spacer)-IFT-COOH, Jerini Peptide Technologies

Durchführung:

Beim Enzym Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) handelt es sich um eine Carboxypeptidase, die in der Thrombose eine wichtige Rolle spielt. TAFI spaltet von der Peptid-Sequenz IFTR das Arginin ab. Diese Reaktion kann entweder durch Massenspektroskopische oder chromatographische Methoden nachgewiesen werden. Beide Methoden sind nicht tauglich für die Hochdurchsatz-Substanz-Testung. Alternativ können mehr oder weniger komplexe Enzymkaskaden oder chemische Reaktionen verwendet werden, die ein messbares Absorptions-,

25 Fluoreszenz- oder Lumineszenzsignal generieren. Bisher ist keine Methode beschrieben, mit der die TAFI-Reaktion direkt gemessen werden kann und die gleichzeitig für einen höheren Durchsatz geeignet ist. Daher wurden die Fluoreszenz-Lebensdauern der Konjugate FJ23 und FJ24 gemessen, die beide einen bei 630 nm anregbaren Fluoreszenzfarbstoff tragen (Evoblue30, Mobitec) und sich nur darin unterscheiden, dass im FJ24-Konjugat das C-terminale Arginin fehlt. FJ23 stellt ein

30 potentielles Edukt für die TAFI-Reaktion dar, während FJ24 das entsprechende Reaktion-Produkt wäre. Die Konjugate FJ23 und FJ24 wurden in einer Konzentration von 60 nM in verschiedenen Puffern mit pH-Werten 6, 7, 8 und 9,5, sowie in Gegenwart von 200 mM und 2 M NaCl gelöst.

## Ergebnis:

Unabhängig vom pH-Wert und der NaCl-Konzentration beträgt die Fluoreszenzlebensdauer von FJ23 ( $552 \pm 45$ ) ps und die von FJ24 ( $2194 \pm 18$ ) ps (s. Fig. 5). Daraus lässt sich ein exzellenter  $z'$ -Faktor von 0.89 berechnen, der einen sehr leistungsfähigen Assay erwarten lässt. Es wurde wie

5 auch schon in den vorgehenden Beispielen für Kinasen, Phosphatasen und Phosphodiesterasen gezeigt, dass sich Fluoreszente Konjugate von Edukten und Produkten synthetisieren lassen, die – in Falle von TAFI – einen sehr großen Unterschied in der Fluoreszenz-Lebensdauer besitzen. Diese große Fluoreszenz-Lebensdauer-Differenz erlaubt den Aufbau eines Assay mit großer Signal-Stabilität und sehr guter Unterscheidung zwischen unterschiedlich stark hemmenden

10 Substanzen. Darüber hinaus wurde in diesem Beispiel eine Lösung für das TAFI-spezifische Problem aufgezeigt, dass bisher für TAFI keine für hohen Durchsatz geeignete Methoden beschrieben sind, die eine direkte Messung der Enzymreaktion ohne sekundäre Nachweisreaktionen erlauben.

Patentansprüche

1. Verfahren zur homogenen, direkten quantitativen Messung von Molekül-Modifikationen dadurch gekennzeichnet, dass das Molekül einen Fluoreszenz-Farbstoff trägt und dass die Fluoreszenz-Lebensdauer des Moleküls sich von der Fluoreszenz-Lebensdauer des modifizierten Moleküls unterscheidet.  
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem Molekül um ein organisches, insbesondere um ein Peptid oder Peptido-Mimetikum, oder anorganisches Molekül handelt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 bis 2, wobei der Fluoreszenzfarbstoff z.B. ein Coumarin-, ein Fluorescein-, ein Rhodamin-, ein Oxazin-, ein Cyanin-Farbstoff sein kann.  
10
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, wobei der Fluoreszenz-Farbstoff kovalent oder nicht-kovalent an das Molekül angekoppelt ist. Zwischen dem Fluoreszenz-Farbstoff und dem Molekül kann sich ein Spacer-Molekül befinden.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4 zur Quantifizierung biochemischer Assays.
- 15 6. Verfahren nach Anspruch 5, bei denen Enzyme folgende Modifikationsreaktionen ausführen können: Phosphorylierung/Dephosphorylierung, Sulfatierung/Desulfatierung, Methylierung/Demethylierung, Oxidationen/Reduktionen, Acetylierung/Deacetylierung, Amidierung/Deamidierung, Cyclisierung/Ringspaltung, Konformationsänderungen, Abspaltung von Aminosäuren/Peptiden/Ankopplung von Aminosäuren/Peptiden, Ringauf-  
20 weitung/Ringverkleinerung, Umlagerungen, Substitutionen, Eliminierungen, Additionsreaktionen.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, für den Einsatz im Hochdurchsatz-Screening.
8. Ein Reagentien-Kit, der Fluoreszenz-Farbstoff-Molekül-Konjugate und andere Reagenzien enthält, die zur Durchführung der Assay-Methode nach Anspruch 1 bis 6 benötigt werden.



Fig. 1:

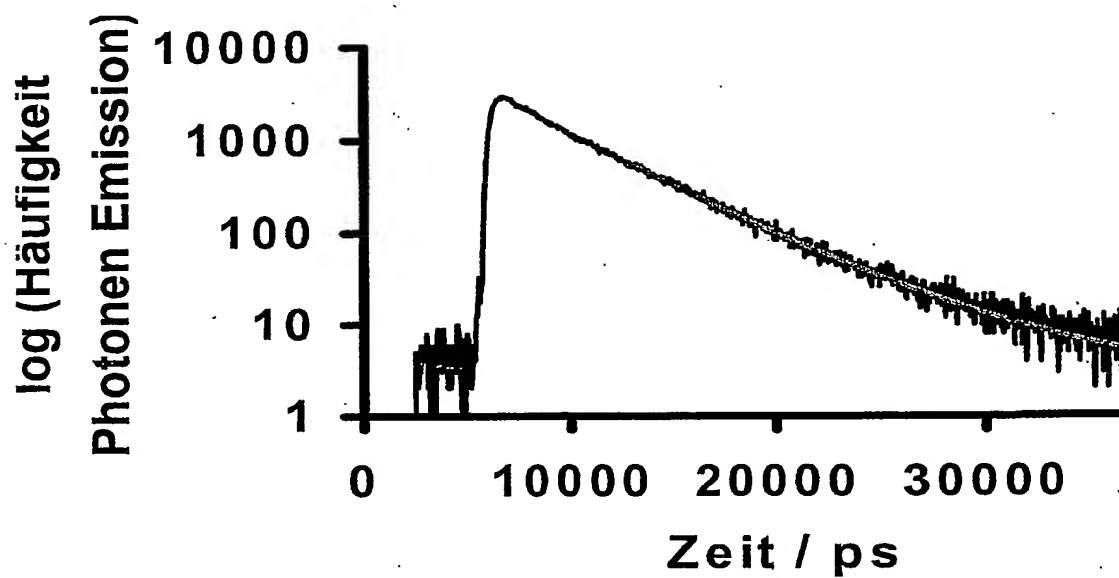


Fig.2:

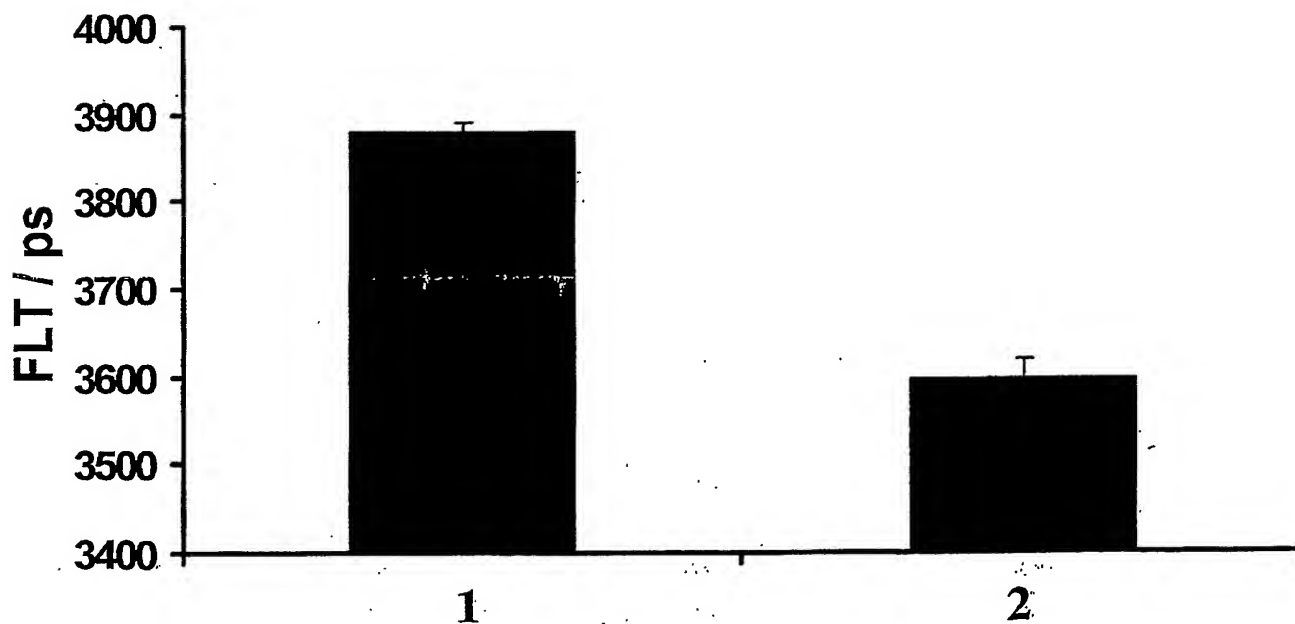


Fig. 3:

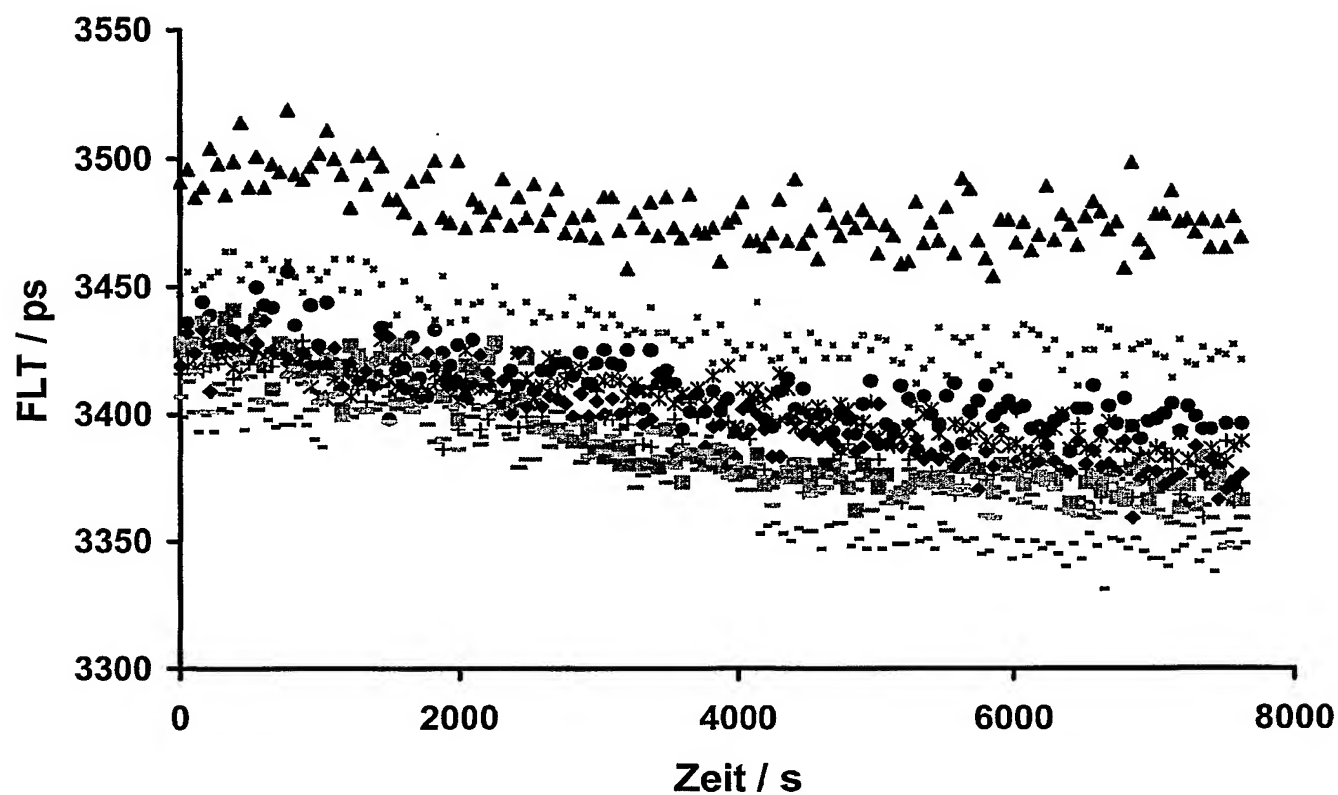
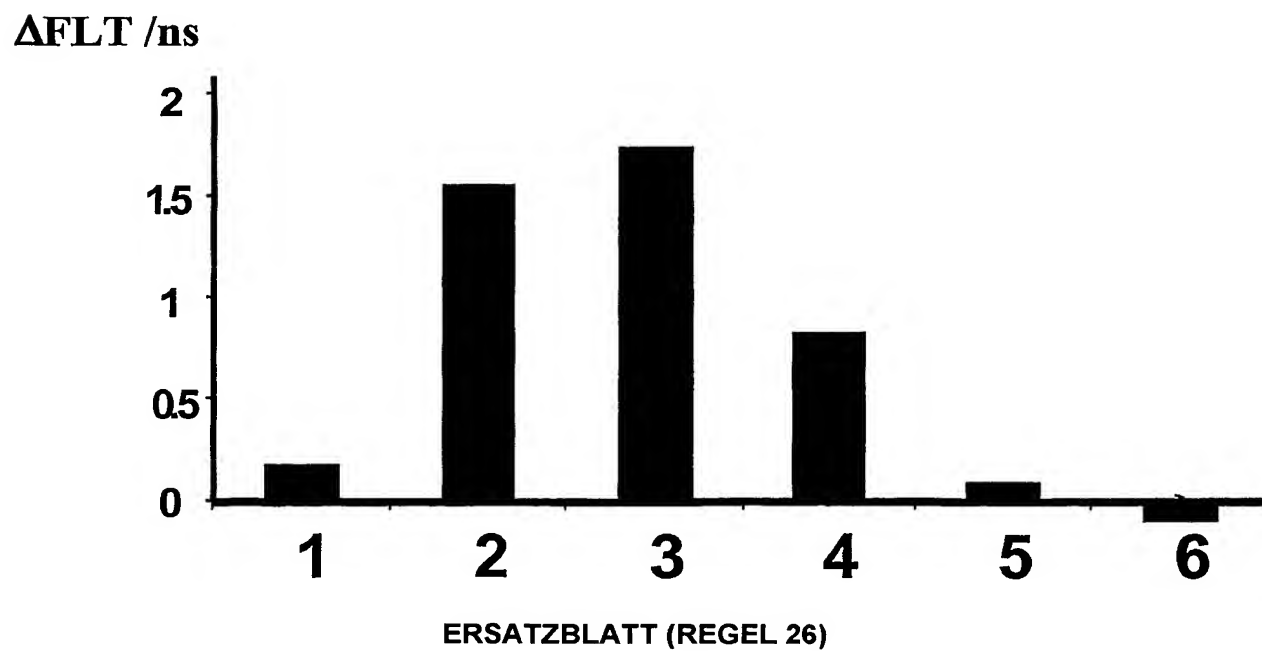


Fig. 4:



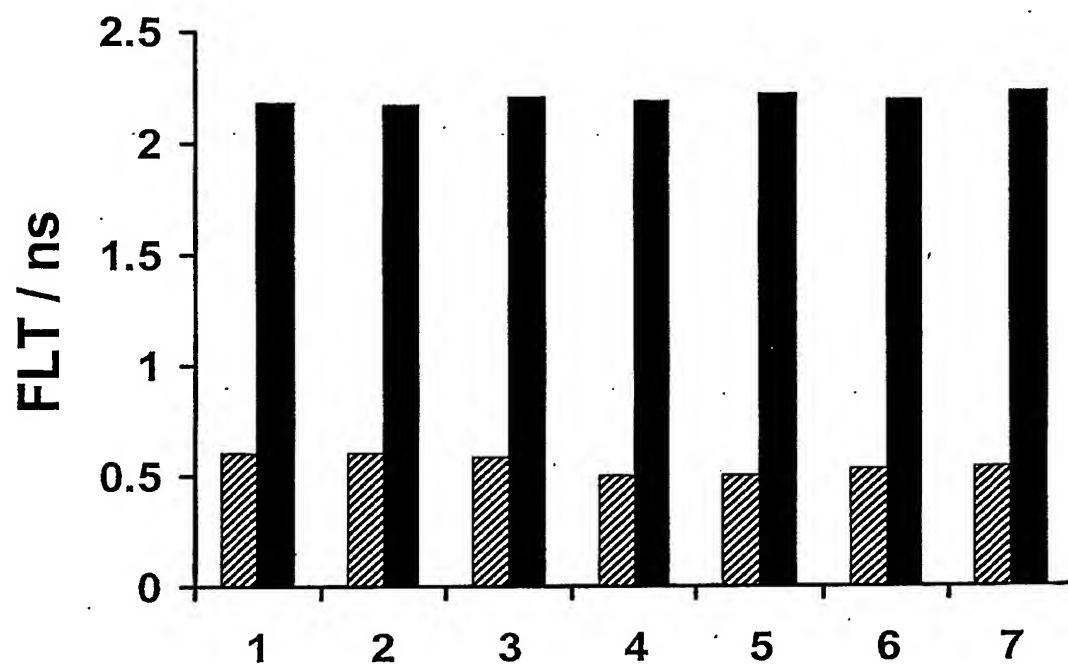


Fig. 5:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/011100

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 G01N21/64 G01N33/52 C12N9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/129649 A1 (KOBILKA BRIAN K ET AL) 10 July 2003 (2003-07-10) page 11, column 1, line 1 - page 17, column 2, line 29	1-8
X	MORTON P E ET AL: "TIME RESOLVED MULTIPHOTON IMAGING OF THE INTERACTION BETWEEN THE PKC AND NFKAPPAB SIGNALLING PATHWAYS" PROCEEDINGS OF THE SPIE, SPIE, BELLINGHAM, VA, US, vol. 5139, no. 1, 2003, pages 216-222, XP001204351 ISSN: 0277-786X the whole document	1-8

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 March 2005

Date of mailing of the international search report

14/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoesel, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/011100

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WOUTERS F S ET AL: "FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING OF RECEPTOR TYROSINE KINASE ACTIVITY IN CELLS" CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE,, GB, vol. 9, no. 19, 27 September 1999 (1999-09-27), pages 1127-1130, XP001036554 ISSN: 0960-9822 the whole document	1-6,8
X	US 2002/063863 A1 (KASK PEET) 30 May 2002 (2002-05-30) page 9, column 1, line 41 - page 11; tables 2,3	1-8
X	COFFIN JILL ET AL: "Detection of phosphopeptides by fluorescence polarization in the presence of cationic polyamino acids: Application to kinase assays" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 278, 15 February 2000 (2000-02-15), pages 206-212, XP002150327 ISSN: 0003-2697 abstract	8
A		1-7
A	EP 0 605 355 A (UNIVERSIDAD DE OVIEDO) 6 July 1994 (1994-07-06) column 7, line 7 - column 9, line 16	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 2004/011100

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003129649	A1	10-07-2003	WO 02086507 A1 US 2004157268 A1	31-10-2002 12-08-2004
US 2002063863	A1	30-05-2002	AU 3925801 A WO 0159436 A2 EP 1254362 A2 JP 2003522946 T	20-08-2001 16-08-2001 06-11-2002 29-07-2003
EP 0605355	A	06-07-1994	ES 2061387 A1 EP 0605355 A1	01-12-1994 06-07-1994

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 2004/011100

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 G01N21/64 G01N33/52 C12N9/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 G01N C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)  
EPO-Internal, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2003/129649 A1 (KOBILKA BRIAN K ET AL) 10. Juli 2003 (2003-07-10) Seite 11, Spalte 1, Zeile 1 - Seite 17, Spalte 2, Zeile 29	1-8
X	MORTON P E ET AL: "TIME RESOLVED MULTIPHOTON IMAGING OF THE INTERACTION BETWEEN THE PKC AND NFKAPPAB SIGNALLING PATHWAYS" PROCEEDINGS OF THE SPIE, SPIE, BELLINGHAM, VA, US, Bd. 5139, Nr. 1, 2003, Seiten 216-222, XP001204351 ISSN: 0277-786X das ganze Dokument	1-8

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, so indem nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. März 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

14/03/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hoesel, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WOUTERS F S ET AL: "FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING OF RECEPTOR TYROSINE KINASE ACTIVITY IN CELLS" CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE,, GB, Bd. 9, Nr. 19, 27. September 1999 (1999-09-27), Seiten 1127-1130, XP001036554 ISSN: 0960-9822 das ganze Dokument	1-6,8
X	US 2002/063863 A1 (KASK PEET) 30. Mai 2002 (2002-05-30) Seite 9, Spalte 1, Zeile 41 - Seite 11; Tabellen 2,3	1-8
X	COFFIN JILL ET AL: "Detection of phosphopeptides by fluorescence polarization in the presence of cationic polyamino acids: Application to kinase assays" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 278, 15. Februar 2000 (2000-02-15), Seiten 206-212, XP002150327 ISSN: 0003-2697	8
A	Zusammenfassung	1-7
A	EP 0 605 355 A (UNIVERSIDAD DE OVIEDO) 6. Juli 1994 (1994-07-06) Spalte 7, Zeile 7 - Spalte 9, Zeile 16	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/011100

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2003129649 A1	10-07-2003	WO 02086507 A1 US 2004157268 A1	31-10-2002 12-08-2004
US 2002063863 A1	30-05-2002	AU 3925801 A WO 0159436 A2 EP 1254362 A2 JP 2003522946 T	20-08-2001 16-08-2001 06-11-2002 29-07-2003
EP 0605355 A	06-07-1994	ES 2061387 A1 EP 0605355 A1	01-12-1994 06-07-1994

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**